



Luonnonvara- ja biotalouden tutkimus 97/2020

# Hiivojen ja homeiden viljely

Menetelmäsovellus kenttäkokeita varten

Maarit Mäki ja Susan Kunnas

Luonnonvara- ja biotalouden tutkimus 97/2020

# Hiivojen ja homeiden viljely

Menetelmäsovellus kenttäkokeita varten

Maarit Mäki ja Susan Kunnas



### **Viittausohje:**

Mäki, M. & Kunnas, S. 2020. Hiivojen ja homeiden viljely : Menetelmäsovellus kenttäkokeita varten. Luonnonvara- ja biotalouden tutkimus 97/2020. Luonnonvarakeskus. Helsinki. 22 s.

Maarit Mäki, ORCID ID, <https://orcid.org/0000-0003-3907-5547>



ISBN 978-952-380-112-7 (Painettu)

ISBN 978-952-380-113-4 (Verkkojulkaisu)

ISSN 2342-7647 (Painettu)

ISSN 2342-7639 (Verkkojulkaisu)

URN <http://urn.fi/URN:ISBN:978-952-380-113-4>

Copyright: Luonnonvarakeskus (Luke)

Kirjoittajat: Maarit Mäki ja Susan Kunnas

Julkaisija ja kustantaja: Luonnonvarakeskus (Luke), Helsinki 2020

Julkaisuvuosi: 2020

Kannen kuva: Virpi Kemppainen

Painopaikka ja julkaisumyynti: PunaMusta Oy, <http://luke.juvenesprint.fi>

# Tiivistelmä

Maarit Mäki<sup>1)</sup> ja Susan Kunnas<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Luonnonvarakeskus (Luke), Myllytie 1, 31600 Jokioinen, maarit.maki@luke.fi

<sup>2)</sup> Luonnonvarakeskus (Luke), Ounasjoentie 6, 96200 Rovaniemi, susan.kunnas@luke.fi

Tähän oppaaseen on koottu havainnollinen ja käytännönläheinen menetelmä hiivojen ja homeiden pesäkemäärän määrittämiseen silloin kun käytössä ei ole laboratoriotiloja. PetriFilm -kasvatusalustat ovat käyttövalmiita kuivia alustoja, joten kasvatusalustojen valmistamiseen ei tarvita laitteita. Tulosten avulla voidaan parantaa mikrobiologista laatua sekä kehittää toimintatapoja ja prosesseja. Menetelmän käyttöönotto vaatii harjaantumista varsinkin silloin kun ei ole aiempaa kokemusta laboratoriotyöskentelystä ja/tai mikrobiologisista menetelmistä. Hiivat ja homeet kasvavat samalla kasvatusalustalla ja niiden erottaminen voi olla haastavaa. Homepesäkkeet voivat olla hyvin suuria ja peittää alleen pienempiä hiivapesäkkeitä. Varsinkin alussa on suositeltavaa, että rinnakkainen näyte tutkitaan laboratoriossa, jotta varmistutaan siitä että tulokset ovat luotettavia. Näyttemateriaalien hiiva- ja homemäärien välillä on myös eroja, ja jokaiselle tutkittavalle materiaalille olisi selvitettävä normaalitasot.

Hiivojen ja homeiden viljely -opas on syntynyt Laatusormenjälki arktiselle luonnonraaka-aineelle (Arctic FingerPrint) – EAKR -hankkeen tuotoksena. Rahoitus hankkeelle on saatu Euroopan aluekehitysrahoituksesta (EAKR) Kestävää kasvua ja työtä 2014–2020. ArcticFingerPrint -hankkeen toisessa oppaassa, Laatu ja laadunhallintaa luonnontuotealalle, on kerrottu tarkemmin villiyrtytien mikrobiologiasta ja hygieniariskeistä sekä luonnontuotteiden laatuun ja laadunhallintaan liittyvistä asioista. (Kunnas ym. 2020)

**Asiasanat:** hiivat, home, yrtit, luonnonkasvit, luonnontuoteala, laatu, laadunhallinta

# Sisälllys

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. Johdanto.....</b>   | <b>5</b>  |
| <b>2. Menetelmän periaate.....</b>                                | <b>6</b>  |
| 2.1. Petrifilm™.....  | 6         |
| 2.2. Tarvikkeet.....  | 7         |
| <b>3. Näytteen viljely.....</b>                                   | <b>8</b>  |
| 3.1. Punnitseminen ja laimentaminen.....                          | 8         |
| 3.2. Viljely petrifilmille.....                                   | 10        |
| 3.3. Hiivojen ja homeiden kasvatus.....                           | 10        |
| 3.3.1. 3M Petrifilm™ Yeast and Mold (YM) Count Plate.....         | 10        |
| 3.3.2. 3M Petrifilm™, Rapid Yeast and Mold (RYM) Count Plate..... | 11        |
| <b>4. Tulosten laskeminen.....</b>                                | <b>12</b> |
| 4.1. Pesäkkeiden tunnistaminen.....                               | 12        |
| 4.2. Pesäkkeiden laskeminen.....                                  | 17        |
| <b>5. Viitteet.....</b>   | <b>21</b> |
| <b>Liite 1. Laimennosliuoksen valmistus.....</b>                  | <b>22</b> |



# 1. Johdanto

Tämä ohje on tarkoitettu yrityksille avuksi villiyrttien hiiva- ja homemäärien arviointiin raaka-aineesta, prosessoinnin aikana sekä lopputuotteesta. Tuloksista nähdään millä tasolla mikrobimäärät ovat ja ne auttavat yritystä parantamaan tuotteiden mikrobiologista laatua, prosessin laatua ja kehittämään toimintaa. Tulosten trendiseurannan avulla todetaan korjaavien toimenpiteiden tehokkuus.

Elintarvikkeissa hiivat ja homeet kuvaavat näytteen yleistä hygieenistä laatua ja tuotteen säilyvyyttä. Mikrobimäärät riippuvat tutkittavista näytteistä ja niiden käsittelystä. Mitä enemmän näytteitä analysoidaan, sekä viljelyä että tulosten lukemista, sitä paremmin niiden tekemiseen harjaantuu. On suositeltavaa, että opetteluvaiheessa samoista tuotteista, jotka on analysoitu tässä kuvatulla menetelmällä, lähetetään näytteet laboratorioon tutkittavaksi, jotta nähdään ovatko tulokset suuruusluokaltaan samanlaisia. Viimeistään siinä vaiheessa kun tuotetta ollaan viemässä markkinoille, näytteet on lähetettävä laboratorioon analysoitavaksi.

Homeet kasvavat rihmastoina ja ne lisääntyvät rihmaston kappaleiden ja itiöiden avulla. Itiöt leviävät helposti ilmapirran mukana. Homeet käyttävät ravinnokseen puuta, paperia ja kaikkia elintarvikkeita. Koska ilman happi on ehdoton edellytys homeiden kasvulle, homeet kasvavat elintarvikkeiden pinnoilla. Eräät homeet tuottavat lisäksi aineenvaihdunnassaan homemyrkyjä eli mykotoksiineja. Homesolut viihtyvät parhaiten +20–+45 °C:ssa ja sekä homeet että niiden itiöt tuhoutuvat +70–+80 °C:ssa. Homeet pystyvät kasvamaan kuivien elintarvikkeiden pinnalla, esimerkiksi leivissä, kuivatuissa hedelmissä ja pähkinöissä, suola- ja sokeriliuosten pinnalla sekä happamissa elintarvikkeissa, kuten hedelmä- ja marjamehuissa sekä hilloissa, sillä niiden suotuisin kasvualue on pH 3–5.

Hiivat ovat yksisoluisia, joskus epämääräisinä soluryhmittyminä esiintyviä mikrobeja, jotka lisääntyvät pääasiassa kuroutumalla mutta myös kahtia jakautumalla. Lisääntyäkseen ne tarvitsevat sokereita, ja sen vuoksi sokeripitoiset mehut, hillot ja marjat ovatkin tyypillisiä hiivojen kasvualustoja. Hiivat tarvitsevat happea, mutta ne pystyvät toimimaan myös hapettomassa, anaerobisessa ympäristössä. Hiivojen optimilämpötila on +20–+35 celsiusastetta, ja yli +45 celsiusasteessa hiivasolut tuhoutuvat. Lisääntymiselle paras pH-arvo on pH 5, mutta ne pystyvät lisääntymään myös pH-alueella 3–8. Hiivat tarvitsevat enemmän kosteutta kuin homeet. (Ruokavirasto 2019).

## 2. Menetelmän periaate

### 2.1. Petrifilm™

Nestemäistä näytettä pipetoidaan petrifilmille 1 ml. Näytteen sisältämä vesi kostuttaa petrifilmillä olevat ravintoaineet ja aikaansaa mikrobeille sopivan kasvuympäristön. Näyte levitetään koko kasvualustalle pakkauksen mukana tulevan muovikiekon avulla.

Hiivat ja homeet kasvatetaan yleensä samalla kasvatusalustalla. Hiivojen ja homeiden määrittämiseen on saatavilla kahta petrifilmialustaa, joissa on eroja pesäkkeiden värin ja kasvatusajan- ja lämpötilan suhteen. Suomessa petrifilmejä myy Labema Oy. Ensimmäistä tilausta tehdessäsi varmista, että petrifilmien mukana on myös muovinen levitin. Ohjeita ja esitteitä on 3M Suomi internet-sivustolla (3M Suomi) ja niitä voi pyytää Labema Oy:stä. (Labema).

3M Petrifilm™ Yeast and Mold (YM) Count Plate on valmis kasvatusalusta hiivojen ja homeiden pesäkemääritystä varten. Se sisältää kylmään veteen liukenevaa, geelityvää ravintoalustaa (Sabourad-ravinteet), johon lisätty väri-indikaattoria fosfataasientsyymille sekä bakteerien kasvua estäviä antibiootteja (kloramfenikoli ja oksitetrasykliini). (3M 2020)

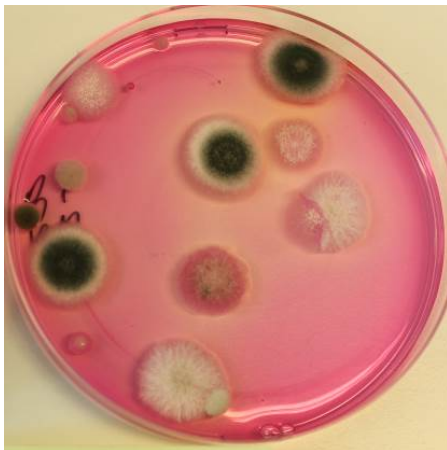
Petrifilm™ Rapid Yeast and Mold (RYM) Count Plate eroaa edellä mainitusta lyhyemmän kasvatusajan (2–2,5 vrk), pesäkkeiden värin sekä korkeamman kasvatuslämpötilan (25–28 °C) suhteen. Ellei kasvatuslämpötilaa ole mahdollista saada riittävän korkeaksi, on suositeltavaa käyttää ensin mainittua petrifilmi-alustaa. (3M 2018)

Lisätietoja ja tilaukset: Labema Oy, Elimäenkatu 9 B, 00510 Helsinki, puh. 09-274 6740,

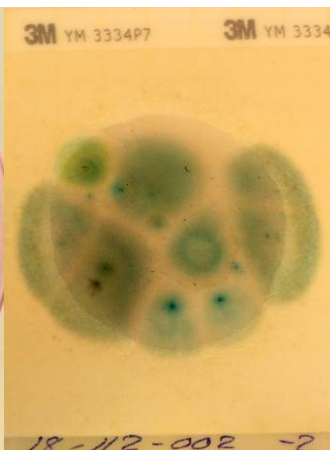
s-posti: labema@labema.fi

Kuvassa 1 näkyy ero laboratoriossa petrimaljalla DRBC-agarilla ja samasta näytteestä petrifilmillä kasvatettujen hiivojen ja homeiden ulkonäön välillä. Näytteessä kasvoi pääasiassa homeita.

a)



b)



**Kuva 1.** Vasemmalla hiivat ja homeet petrimaljalla DRBC – agarilla ja oikealla petrifilmillä kasvatetut hiivat ja homeet.

Avaamaton foliopakkaus säilytetään jääkaapissa tai pakastimessa alle 8 °C:ssa. Ennen käyttöä avaamattomien pussien on annettava lämmetä huoneenlämpöiseksi juuri ennen avaamista ja käyttöä. Petrifilmit ovat herkkiä kosteudelle, lämmölle ja valolle. Älä käytä alustoja jos huomaat värimuutoksia tai jos alustojen päiväysmerkintä on mennyt vanhaksi.

Käyttämättömät alustat säilytetään omassa pakkauksessaan tiiviisti teipillä suljetussa pussissa. Jääkaappisäilytys altistaa alustat kosteudelle, joten säilytä avattu petrifilmipussi joko kuivassa huoneenlämmössä (alle 21 °C:ssa enintään kuukauden) tai pakastimessa jos laboratoriossa on yli 25 °C ja/tai siellä on kostea ilma (yli 50 %, poikkeuksena ilmastoidut tilat).

Pakastimessa petrifilmit asetetaan tiiviiseen rasiaan, josta niitä otetaan kerralla tarvittava määrä ja rasia laitetaan heti takaisin pakastimeen. Pakastimessa ei saa olla automaattista sulatus-toimintoa, koska se altistaa petrifilmit toistuvasti kosteudelle.

## 2.2. Tarvikkeet

Analyysia varten tarvitaan seuraavat reagenssit ja tarvikkeet:

1. Käsidesinfiointiainetta, tarvittaessa kertakäyttöhansikkaat
2. Laimennosliuoksena käytetään suolaliuosta, jonka voi valmistaa itse tai ostaa valmiina apteekista. Apteekissa myydään 0,5 litran pullossa 0,9 % huuhteluun tarkoitettua suolaliuosta n. 3,10 €/pullo. Liitteessä 1 on suolaliuoksen valmistusohje.
3. Litran muovipulloja, punnitusastia, lusikoita, sakset, desimitta. Desinfioi kuumalla vedellä.
4. Voipaperia näytteen punnitsemiseen ellei käytettävissä ole punnitusastiaa.
5. Vaaka, oltava riittävä tarkkuus, vähintään 0,1 g.
6. Kertakäyttöpipettejä, 1 ml. Saatavilla steriilinä tai steriloimattomana esim. VWR:ltä. Pakkauksissa 500 kpl pipettejä. Steriloimattomiakin voi käyttää koska niissä todennäköisesti ei ole hiivoja tai homeita. Jokaisen viljelyn yhteydessä kuitenkin on syytä varmistaa kontrollilla laimennosliuosten ja välineiden puhtaus.
7. Petrifilmejä ja niille levitin. Huom! Perinteisten Hiiva- ja home Petrifilmien levittimet ovat packageissa (C6407 ja C6417 3M™ Petrifilm™ Yeast and Mould Count Plates). Nopean RYM-alustan kanssa (C6475 ja C6477 3M™ Petrifilm™ Rapid Yeast and Mould Count Plates) on levitin ostettava erikseen (levitin C6425).



### 3. Näytteen viljely

Kasvinäytteet voivat olla tuoreita, kuivattuja tai jauheita. Näytetyypistä riippuen niiden hiiva- ja homemäärissä voi olla huomattavia eroja. Analyysiin punnittava näytemäärä voi vaihdella, mutta on tärkeää että näyte on edustava ja riittävän suuri. On myös huomioitava, että laimennosliuoksen tehokas sekoittaminen edellyttää, että pullossa on riittävästi tyhjää tilaa. Litran pullossa sekoittuminen varmistetaan kun se on puolillaan laimennosliuosta. Mitä korkeampi hiiva ja/tai homemäärä sitä enemmän näytettä on laimennettava, jotta tulokset voidaan lukea luotettavasti petrifilmiltä. Esimerkiksi kuusenkerkän hiiva- ja homemäärät ovat pienempiä kuin nokkosella. Näyte laimennetaan laimennosliuoksella suhteessa 1 osa näytettä ja 9 osaa laimennosliuosta. Jatkolaimennos (laimennossarja) tehdään ottamalla tästä laimennoksesta näyte, johon lisätään samassa suhteessa kuin edellä laimennosliuosta. Näin saadun laimennoksen kokonaistilavuudesta tai -painosta on siis yksi kymmenesosa joko näytettä tai edellistä laimennosta. Näin jatketaan kunnes on saavutettu riittävän laimea liuos. Taulukossa 1 on kuvattu näytteen laimennossarja.

Tuotteen ja raaka-aineen laatuvaatimuksissa voidaan määrittää hyväksyttävä homepesäkkeiden raja-arvo. Esimerkiksi aiempien tulosten perusteella näytteessä arvioidaan olevan noin 10 000 homepesäkettä grammassa. Jos pesäkemäärä petrifilmillä ylittää 150, tulokset eivät ole enää luotettavia. Näytteestä valmistetaan laimennossarja, joka mahdollistaa selkeiden pesäkkeiden kasvamisen ja niiden laskemisen. Homepesäkkeet kasvavat tyypillisesti suurikokoisina ja selvimmät tulokset saadaan kun pesäkkeitä on vähän. Kannattaa tehdä viljely useammasta peräkkäisestä laimennoksesta erityisesti silloin kun ei vielä tiedetä kuinka suuria pesäkemäärät voivat olla.

**Taulukko 1.** Laimennossarjan tekeminen näytteelle, jossa arvioidaan olevan noin 10 000 homepesäkettä grammassa. Tulokset lasketaan ottamalla huomioon laimennosten määrä. Ks. tulosten laskeminen. Pmy tarkoittaa pesäkkeitä muodostavaa yksikköä.

|   |  |
|---|--|
| Näytteessä 10 000 pmy/g homepesäkkeitä  | 0-laimennos = 10 000 pmy/g   |
| Punnitaan 1 g näytettä + 9 g laimennosliuosta                                       | 1. laimennos = 1 000 pmy/g   |
| Punnitaan tai pipetoidaan 1 g/ml näytettä 1. laimennoksesta + 9 ml laimennosliuosta | 2. laimennos = 100 pmy/g → riittävä laimennos, pesäkkeiden laskeminen voi kuitenkin olla hankalaa. |
| Punnitaan tai pipetoidaan 1 g/ml 2. laimennoksesta + 9 ml laimennosliuosta          | 3. laimennos = 10 pmy/g → riittävä laimennos   |

#### 3.1. Punnitseminen ja laimentaminen

Ota petrifilmit huoneenlämpöön 30 min ennen kuin aloitat tekemään viljelyn (Kuva 2). Varaa riittävästi tilaa työskentelyä varten sellaisesta huoneesta, jossa on mahdollisimman puhtaat olosuhteet ja josta näytteisiin ei pääse ympäristöstä hiivoja tai homeita. Pyyhi pöytä esim. käsien desinfiointiaineella ja aina tarvittaessa.



**Kuva 2.** Näytteen punnitseminen ja laimentaminen.

Näyte punnitaan joko suoraan laimennospulloon tai jos se on hankalaa, avosuiseen astiaan tai puhtaalle voipaperille tai vastaavalle, josta se siirretään laimennospulloon. Lisätään laimennosliuosta siten että 1 osaan näytettä lisätään 9 osaa laimennosliuosta punnitsemalla. Laimennos sekoitetaan hyvin kääntämällä pulloa ylösalaisin rauhallisin liikkein 25 kertaa. Esimerkiksi tuoretta näytettä voidaan punnita enemmän kuin kuivattua jauhetta. Kun käytetään litran pulloja, sekoittaminen onnistuu parhaiten, kun näytettä punnitaan 50 g ja laimennosliuosta 450 g. Laimennoksessa on siis 50 g näytettä 500 g:ssa eli 1:10 laimennos.

Jatka laimentamista punnitsemalla ensimmäisestä laimennospullostä tyhjään muovipulloon yksi osa valmista laimennosta ja lisää siihen 9 osaa laimennosliuosta. Litran pulloon tehtävässä laimennoksessa punnitaan jälleen 50 g valmista laimennosta ja lisätään 450 g laimennosliuosta, jolloin saadaan 1:100 laimennos eli alkuperäistä näytettä on silloin 5 g 500 g:ssa. Sekoita kuten edellä. Tarvittaessa voit tehdä vielä kolmannen laimennoksen vastaavasti ottamalla toisesta laimennoksesta 1 osa laimennosta ja lisää 9 osaa laimennosliuosta, jolloin saadaan 1:1000 laimennos.

Vastaavalla tavalla, jos kyseessä on kuivattu ja jauhettu näyte, niin näytettä voidaan punnita vähemmän, esimerkiksi 10 g, jolloin lisätään 90 g laimennosliuosta. Laimennospullo voi silloin olla vastaavasti pienempi, mutta kuitenkin niin, että tehokas sekoittaminen onnistuu. Laimennossarja tehdään vastaavasti kuten edellä.

## 3.2. Viljely petrifilmille

Viljely petrifilmille tapahtuu seuraavien vaiheiden kautta (Kuva 4):

1. Varaa laimennosta kohti yksi tai kaksi petrifilmiä ja aseta petrifilmit tasaiselle pinnalle vaakatasoon.
2. Merkitse kynällä petrifilmin ylä- tai alareunaan laimennos, näytteen nimi ja päivämäärä.
3. Nosta päällyskalvoa ja annostele pipetillä kohtisuoraan 1 ml näytesuspensiota pohjakalvon keskelle.
4. Pudota päällyskalvo alas näytteen päälle ilmakuplia välttäten.
5. Aseta muovikiekko kädensijasta kiinni pitäen alustan keskelle. Paina kiekkoa hellävaraisesti keskeltä, jotta näyte leviää tasaisesti. Levitä näyte petrifilmin koko kasvatus-alueelle, ennen kuin geeli muodostuu. Älä liikuta tai vedä kiekkoa kalvoa pitkin.
6. Poista kiekko ja anna petrifilmin seistä häiriöttä vähintään minuutin ajan, jotta geeli saa muodostua rauhassa.

Samalla tavalla pipetoi kustakin laimennosvesipullostasta näyte yhdelle tai kahdelle petrifilmille. Kontrollinäytteellä varmistetaan puhtaus, niin että puhdasta laimennosliuosta pipetoidaan vastaavasti 1 ml kertakäyttöpipetillä. Näin varmistetaan mahdolliset kontaminaatiot työskentelyssä, välineissä tai laimennosliuoksessa.

Huom! Kertakäyttöpipettejä (Kuva 3) voi säästää tekemällä ensimmäiseksi viljelyn laimeimmasta liuoksesta ja seuraavaksi samalla pipetillä edeltävästä laimennoksesta. Ennen kuin otat näytteen petrifilmille, huuhto kuitenkin pipetti vahvemmallalla laimennoksella, jotta näyte ei laimenisi. Näytteiden välillä pipetti on vaihdettava.



**Kuva 3.** Esimerkki kertakäyttöpipetistä.

## 3.3. Hiivojen ja homeiden kasvatus

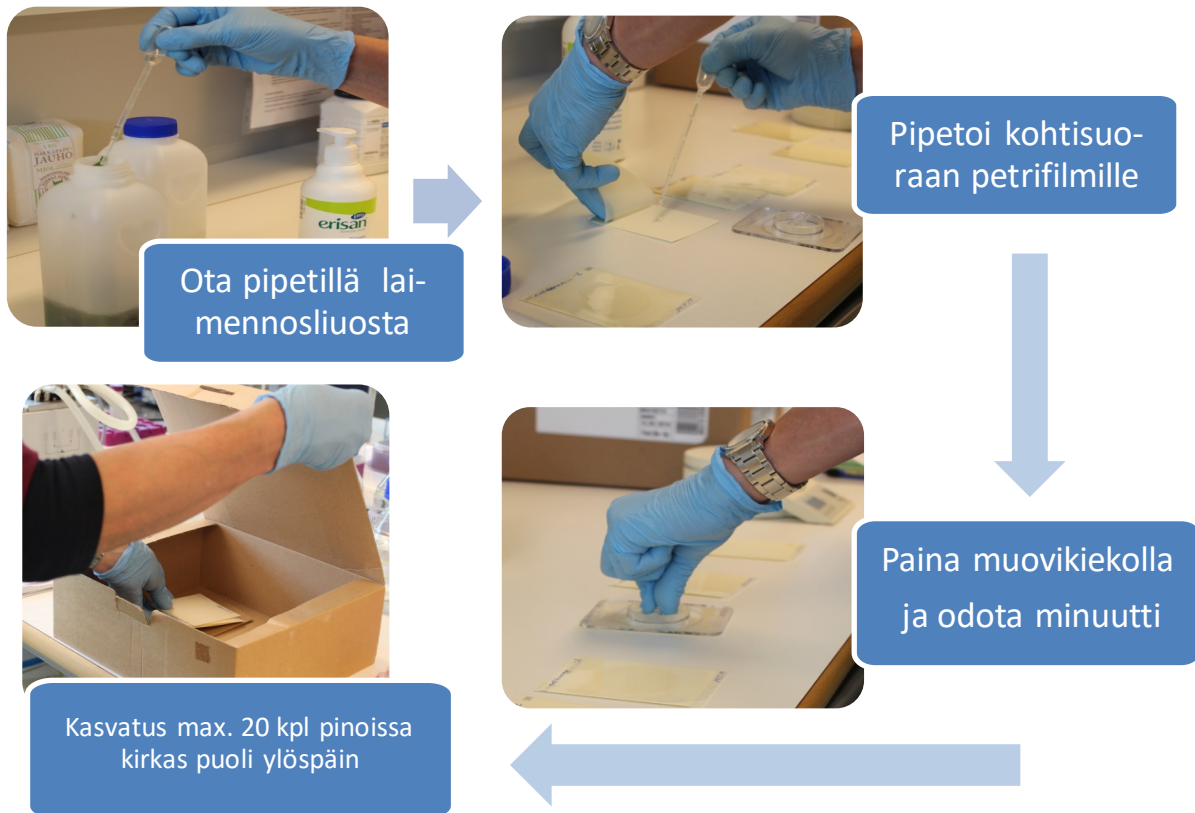
Kun olet viljellyt kaikki näytteet, laita ne vaakatasossa kiiltävä pinta eli kirkas puoli ylöspäin enintään 20 kappaletta päällekkäin lämpökaappiin tai pahvi- tai styroxlaatikoon, jos kasvatat huoneenlämmössä. Tarkista huoneen lämpötila että se on riittävän korkea koko kasvatuksen ajan, 20–25 °C 3–5 vrk tavallisella petrifilmillä (YM) tai 25–28 °C 2–2,5 vrk pika-alustalla (RYM).

### 3.3.1. 3M Petrifilm™ Yeast and Mold (YM) Count Plate

YM petrifilmejä kasvatetaan 3–5 vrk huoneenlämmössä eli 20–25 asteessa. Jotkut homepesäkkeet voivat levitä voimakkaasti, joten tarkista ja laske 3 vrk kuluttua pesäkkeet ja tarvittaessa käytä tätä tulosta arviona jos 5 vrk jälkeen pesäkkeitä ei pysty erottelemaan.

### 3.3.2. 3M Petrifilm™, Rapid Yeast and Mold (RYM) Count Plate

RYM - petrifilmejä kasvatetaan 25 tai 28 asteessa vähintään 48–60 tuntia (2–2,5 vrk). Jos pesäkkeet ovat vielä pieniä tai epäselviä kasvatusajan jälkeen, niin jatka kasvatusta vielä 12 tuntia. Joissain elintarvikkeissa kasvu ja pesäkkeiden ulkonäkö on selvempää 28 asteessa. Jotkut elintarvikkeet sisältävät entsyymejä, jotka voivat aiheuttaa petrifilmin värjäytymisen, vaikka siinä ei kasvaisikaan pesäkkeitä.



**Kuva 4.** Laimennosten viljely petrifilmille ja kasvatus.

## 4. Tulosten laskeminen

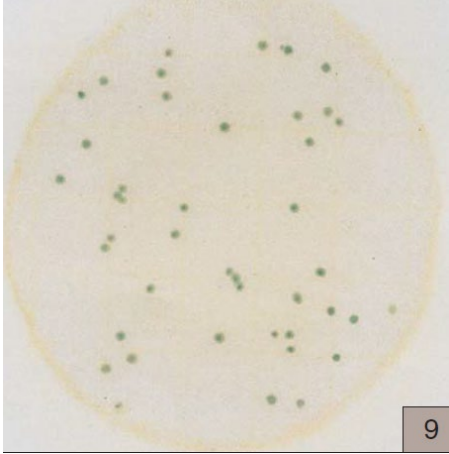
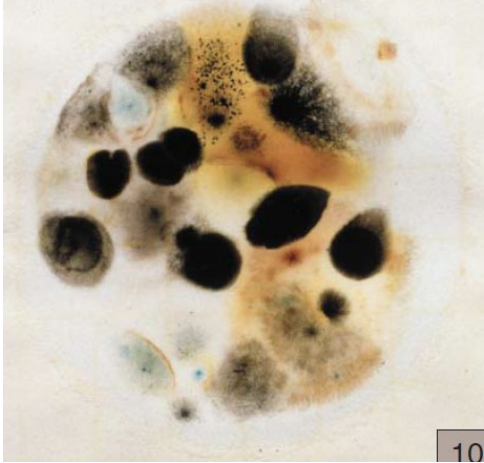
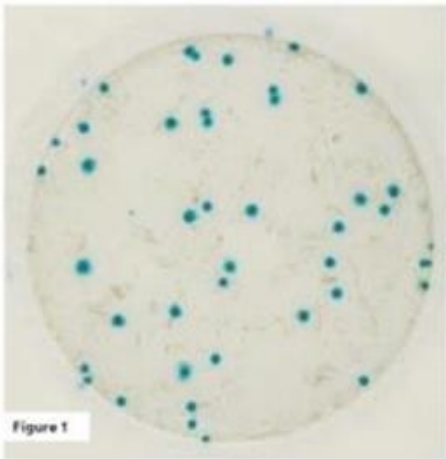
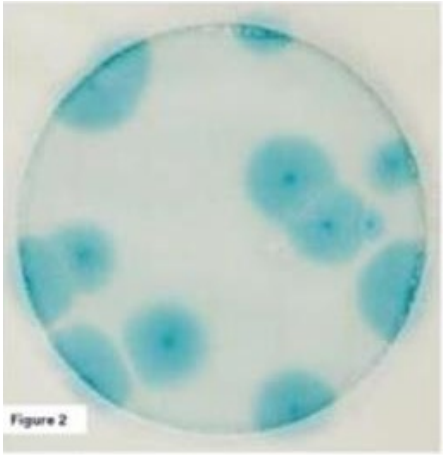
### 4.1. Pesäkkeiden tunnistaminen

Tässä ohjeessa keskitytään homepesäkkeiden laskemiseen vaikka samalla alustalla kasvaakin hiivoja (Taulukot 2, 3 ja 4). Homepesäkkeiden ulkonäköön vaikuttaa mm. näyte, homelaji ja pesäkkeiden lukumäärä. Jos petrifilmillä on runsaasti homepesäkkeitä, ne ovat pienempiä kooltaan kuin sellaisilla petrifilmeillä, joissa on vähän pesäkkeitä. Jos on tarvetta homeiden tunnistamiseen, siihen voi pyytää apua lähimmästä elintarvike- tai ympäristölaboratoriosta. Pesäkkeiden laskemisessa noudatetaan Ruokaviraston toimintaohjetta LAB 703/1 Mikrobiologisten tulosten laskeminen.

Petrifilmin kalvoa ei nosteta kun pesäkkeitä lasketaan. Jos on kuitenkin epävarmaa, onko kyseessä hiiva vai home, sen voi tarkistaa nostamalla kalvoa. Kasvatusalusta voi kuitenkin rikkoontua nostamisessa, mikä voi häiritä tulosten laskemista. Pesäkkeiden laskemisessa voi käyttää apuna suurennuslasia. Jos pesäkkeiden erottamisessa on vaikeuksia, petrifilmien kasvattamista voi jatkaa puoli vuorokautta (RYM) ja laskea sen jälkeen. Ellei pesäkkeistä olla vielä varmoja ovatko ne homeita, niin kasvatusta voi jatkaa seuraavaan päivään. Petrifilmejä voi säilyttää jääkaapissa ja ne voi laskea uudelleen seuraavana päivänä ja vielä uudelleen myöhemmin, mutta korkeintaan kolmen vuorokauden kuluttua. Petrifilmit voi valokuvata, jolloin tuloksia voi verrata seuraaviin näytteisiin.

Joskus homepesäkkeet ovat voineet levitä niin, että ne peittävät muita pesäkkeitä. Tämä hankaloittaa laskemista. Jos pesäke peittää alle neljäsosan petrifilmistä, voidaan laskea pesäkkeet puolikkaasta ja kertoa kahdella. Jos pesäke on kooltaan suurempi kuin neljäsosa, ei pesäkkeitä lasketa. Tulokseksi ilmoitetaan "levinneitä pesäkkeitä". Hiiva- ja homepesäkkeet tunnistetaan seuraavien yhden tai useamman piirteen perusteella.

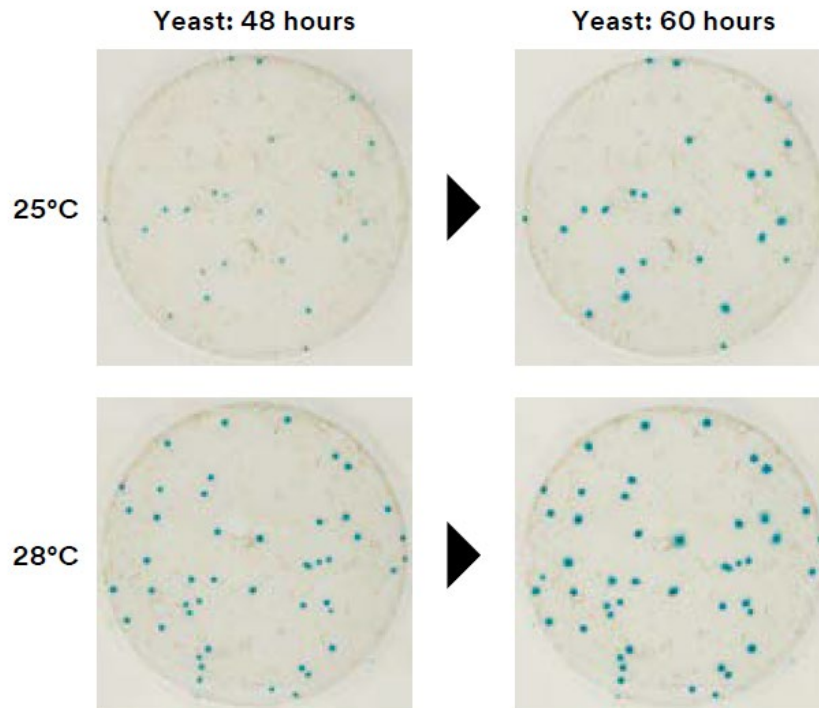
**Taulukko 2.** Hiivan ja homeen erottaminen YM- ja RYM-petrifilmi-alustalla.

| HIIVA  | HOME  |
|--|---|
| Pienet pesäkkeet   | Suuret pesäkkeet  |
| Selvärajaiset pesäkkeet, voi olla koholla  | Pesäkkeissä epätasaiset reunat  |
| Vaaleanpunaruskea tai sinivihreä väri  | Vaihteleva väri (sininen, musta, vihreä...)   |
| Korkeat, kolmiulotteiset pesäkkeet   | Litteät pesäkkeet   |
| Pesäkkeissä tasainen väri, ei tummaa keskikohtaa   | Pesäkkeissä tumma tai erivärinen keskus   |
| YM-petrifilmi:<br>   | YM-petrifilmi:<br>   |
| <b>Kuva 5.</b> Hiivapesäkkeitä 43 kpl.   | <b>Kuva 6.</b> Homepesäkkeitä 29 kpl.   |
| RYM-petrifilmi:<br> | RYM-petrifilmi:<br> |
| <b>Kuva 7.</b> Hiivapesäkkeitä 44 kpl.   | <b>Kuva 8.</b> Homepesäkkeitä 12 kpl.   |

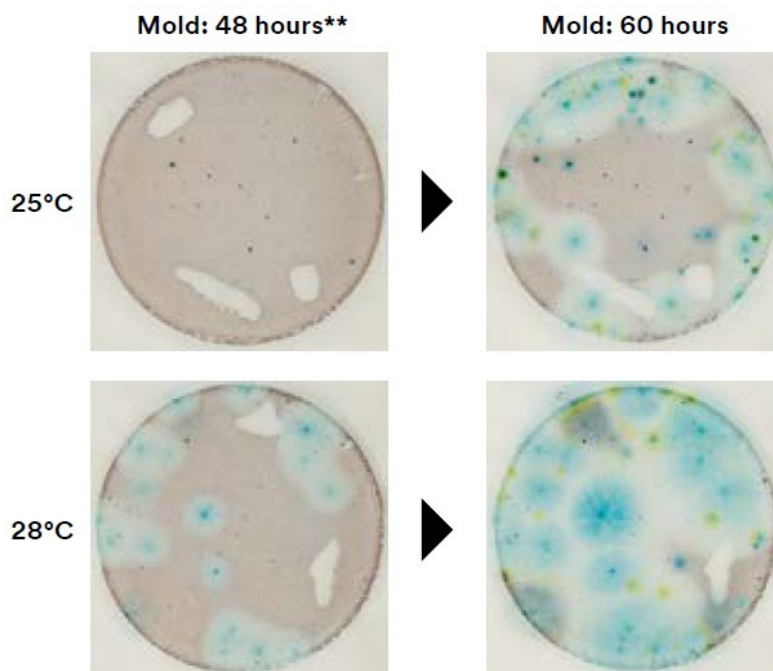


**Taulukko 3.** RYM - petrifilmillä kasvatusaika ja lämpötila voivat vaikuttaa pesäkkeiden koon ja ulkonäköön.

Hiivapesäkkeiden erot kun kasvatuslämpötila on 25 tai 28 astetta, 48 tai 60 tuntia. Kun kasvatuslämpötila on 25 astetta, niin 12 tuntia pidempi kasvatusaika suurentaa pesäkkeiden kokoa. Korkeammassa kasvatuslämpötilassa pesäkkeet kasvavat nopeammin.


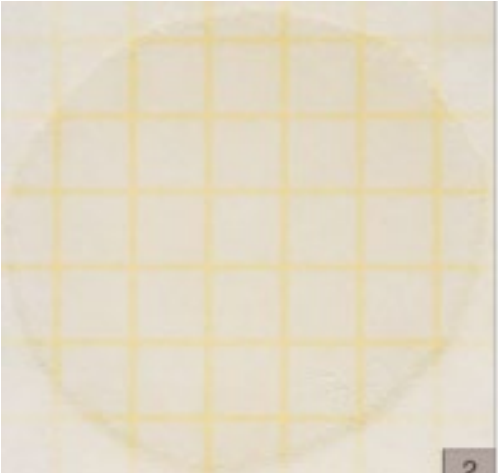
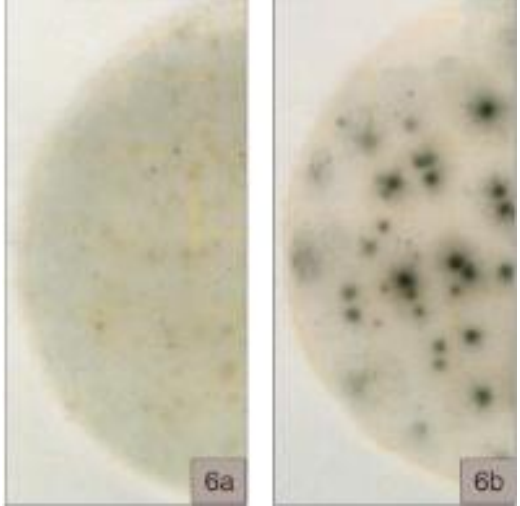


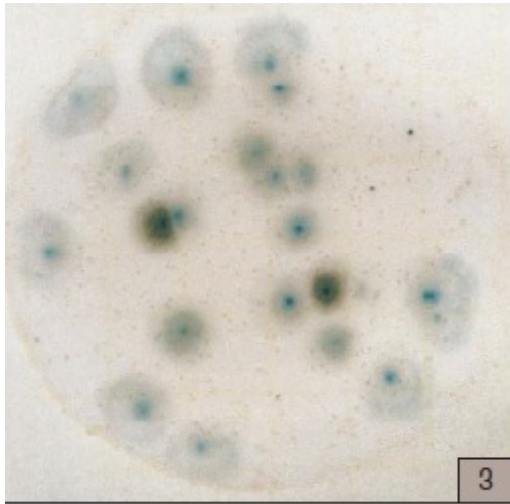
**Kuva 9.** Hiivat ja homeet RYM-petrifilmillä 25 tai 28 asteessa 2 tai 2,5 vrk kasvatuksen jälkeen.



**Kuva 10.** Vastaavasti homepesäkkeet ovat kasvaneet nopeammin 28 asteessa. Pienet ilmakuplat kalvon alla eivät estä luotettavaa tulosta.

**Taulukko 4.** Hiivojen ja homeiden kasvu YM-hiiva ja homealustalla. Kuvat: 3M Petrifilm Yeast and Mold Count Plate. Interpretation guide.

|  |   |
|--|---|
|   |   |
| <p><b>Kuva 11.</b> Kokonaismäärä 20, josta hiivoja 16 ja homeita 4.</p>            | <p><b>Kuva 12.</b> Kokonaismäärä 0. (Kontrollinäyte)</p>  |
|  | <p>Kuvassa on samasta näytteestä tehty viljely. Vasemmalla (6a) homepesäkkeitä on niin paljon, että niitä ei pysty laskemaan. Pesäkkeet ovat pieniä, vaaleita eikä niitä pysty erottelemaan. Kasvu on niin tiheää että pesäkkeiden tyypillinen kasvu on estynyt. Oikealla (6b) suuremmassa laimennoksessa pesäkkeitä on alle 150 kpl ja ne voidaan helpommin laskea. Tämän vuoksi suositellaan, että näytteistä, joissa epäillään olevan runsaasti homeita, tehdään lisälaimennoksia.</p> |
| <p><b>Kuva 13.</b> Laimentamisen vaikutus pesäkemääriin.</p>                       |   |



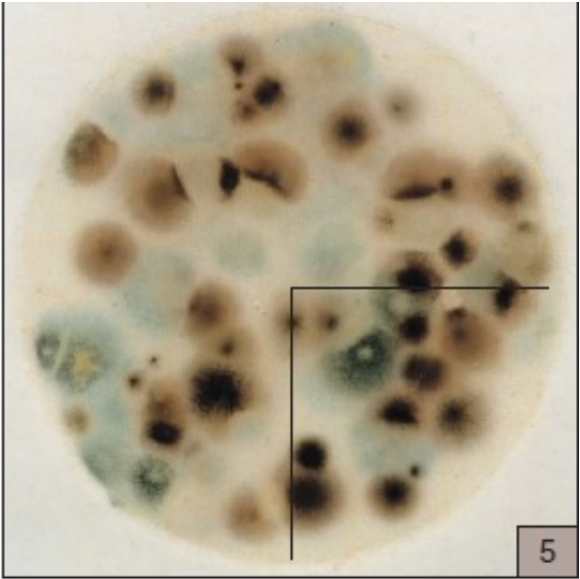
**Kuva 14.** Tiheästi kasvaneiden pesäkkeiden laskeminen.

Kun pesäkkeitä on yli 150 kpl, arvioi pesäkemäärä. Arvioi keskimääräinen pesäkemäärä neliösentillä ja kerro se 30:llä, jolloin saat kokonaispesäkemäärän koko petrifilmillä. Tulos ilmoitetaan tässä tapauksessa. Kokonaispesäkemäärä (arvio, hiivat ja homeet) 500 kpl, hiivat (arvio) 480 kpl ja homeet (arvio) 21 kpl.

## 4.2. Pesäkkeiden laskeminen

Petrifilmit voidaan laskea tavallisella pesäkelaskurilla tai muulla valaistulla suurennuslasilla (Taulukko 5). Älä laske vaahdon patoamia pesäkkeitä, koska ne eivät ole elatusaineen selektiivisen vaikutuksen piirissä. Älä laske myöskään mahdollisesti esiintyviä kuplia. Alustoilla, jotka sisältävät enemmän kuin 150 pesäkettä, pesäkeluku voidaan arvioida laskemalla pesäkkeiden määrä kahdessa tai useammassa edustavassa neliösentin kokoisessa ruudussa ja määrittämällä keskimääräinen pesäkeluku ruutua kohti. Kun kerrot keskimääräisen luvun kasvualueella olevien ruutujen kokonaismäärällä, saat koko alustan arvioidun pesäkeluvun.

**Taulukko 5.** Pesäkkeiden laskeminen.

|  |   |
|--|---|
|  | <p>Homepesäkkeet ovat tiheästi ja osittain peittävät toisensa. Laskemista voidaan helpottaa jakamalla petrifilmi sektoreihin. Tässä esimerkissä noin neljännes petrifilmistä on laskettu, kerrottu tulos neljällä, jolloin saadaan arvio pesäkemäärästä. Tässä sektorissa pesäkkeitä on 16 kpl.</p> |
| <p><b>Kuva 15.</b> Tiheästi kasvaneiden pesäkkeiden laskeminen.</p>                |   |

Kun pesäkkeitä on hyvin paljon, geelin väri tummenee. Niissä voi olla paljon pieniä, epäselviä pesäkkeitä ja/tai paljon kaasukuplia. Tällöin tulos on liian suuri laskettavaksi (ylikasvua). Mikäli tarkka tulos tarvitaan, on tehtävä suurempi laimennos. Jos petrifilmissä ei erotu pesäkkeitä, mutta alusta on muuttunut siniseksi, niin nosta kalvoa ja katso erottuuko siinä valkoisia pisteitä, jotka voivat olla hiivapesäkkeitä. Ilmoita tulos ylikasvuna. Huomioi kuitenkin, että joidenkin elintarvikkeiden sisältämät entsyymit saattavat muuttaa väriä.

Ellei alustoja voida laskea 1 tunnin sisällä kasvatuksen päättymisen jälkeen, ne voidaan säilyttää pakastimessa tiiviissä rasiassa -15 °C:n lämpötilassa myöhempää laskentaa varten enintään viikon.

Näytteet voidaan viljellä laimennoksista yhdelle tai kahdelle rinnakkaiselle petrifilmille. Kahden petrifilmin käyttäminen ei ole välttämätöntä, mutta se parantaa tulosten luotettavuutta. Tulosten laskemisessa käytetään painotettua keskiarvoa, jossa huomioidaan peräkkäisistä laimennoksista ja rinnakkaisista petrifilmeistä saatu tulos.

Laskettaessa pesäkkeitä kahdesta peräkkäisestä laimennoksesta kahdelta rinnakkaiselta petrifilmiltä painotetun keskiarvon kaava on seuraava:

$$N = \frac{C1 + C2 + C3 + C4}{(2 \times 1\text{ ml} + 2 \times 0,1 \text{ ml}) \times d}$$

N on pesäkemäärä pmy/g tai pmy/ml (pmy = pesäkkeitä muodostavaa yksikköä)

C1–C4 ovat petrifilmeillä kasvaneiden pesäkkeiden lukumääriä

Viivan alla d on ensimmäinen (pienempi) laskentaan käytetty laimennos

Esimerkiksi:

Näytettä on punnittu 50 g ja siihen on lisätty 450 g laimennosliuosta, jolloin on saatu 1:10 laimennos. Tästä on jatkettu seuraava laimennos, jolloin on punnittu 50 g ensimmäisestä laimennoksesta ja lisätty 450 g laimennosliuosta, jolloin on saatu 1:100 laimennos. Viljely on tehty kahdelle rinnakkaiselle petrifilmille pipetoimalla 1 ml laimennosliuosta. Pesäkkeitä on ollut ensimmäisessä laimennoksessa 45 ja 50 kpl, toisessa 3, ja 5 kpl.

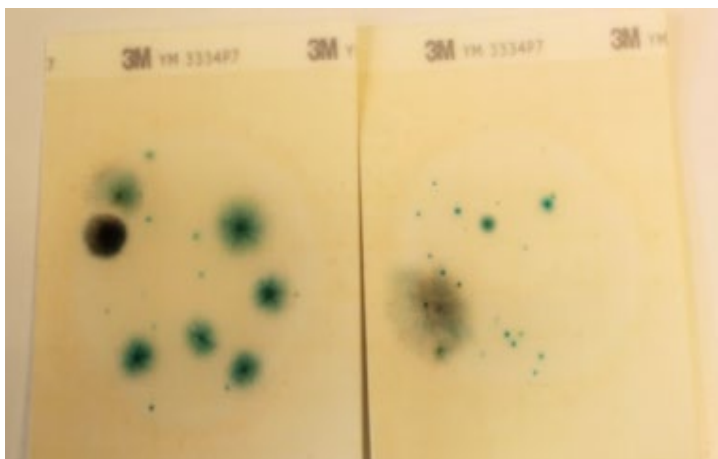
$$N = (45 + 50 + 3 + 5) / [(2 \times 1 \text{ ml} + 2 \times 0,1 \text{ ml}) \times 0,1] = 468 \text{ kpl/g}$$

Tulos pyöristetään 470 kpl/g.

### 4.3. Esimerkkejä

Esim. 1. Tuorepakastetussa nokkosessa on ollut 1:100 eli (-2) laimennoksessa vähemmän homeita ja tulokset ovat olleet selvemmin luettavissa. YM-petrifilmi.

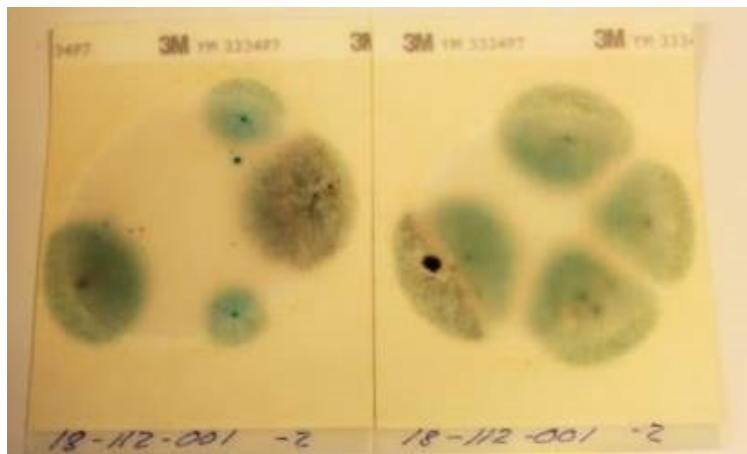
$$\frac{7 + 3}{(2 \times 1 \text{ ml}) \times 0,01} = 10 / 0,02 = 500 \text{ pmy/g}$$



**Kuva 16.** Tuorepakastetun nokkoson homepesäkkeitä.

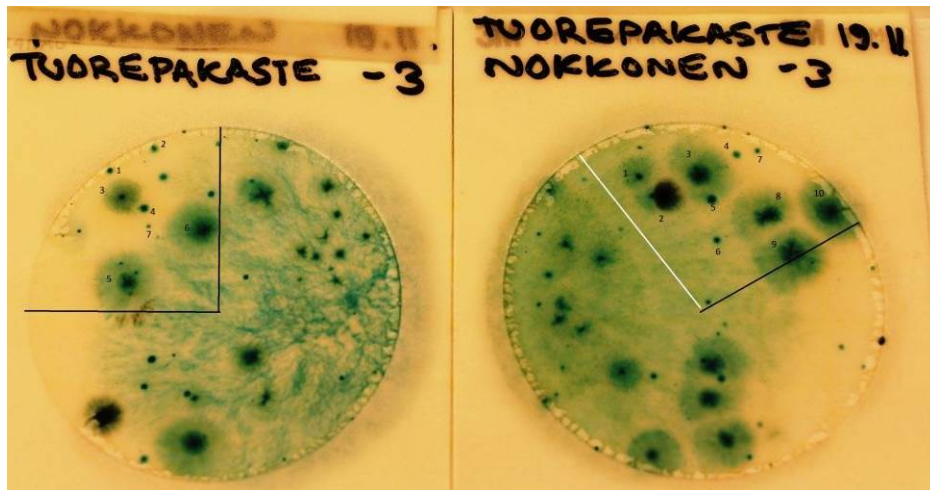
Esim. 2. Tuorepakastetuissa ruusujuuren juurissa on ollut 1:100 eli (-2) laimennoksessa vähemmän homeita. YM-petrifilmi

$$\frac{4 + 4}{(2 \times 1 \text{ ml}) \times 0,01} = 8 / 0,02 = 400 \text{ pmy/g}$$



**Kuva 17.** Tuorepakastetun ruusujuuren homepesäkkeitä.

Esim. 3. Tuorepakastettu nokkonen, RYM-petrifilmi. Tehty laimennokset 1:100 (-2) ja 1:1000 (-3). Tulokset on laskettu (-3) laimennoksesta koska (-2) laimennoksesta pesäkkeiden laskeminen olisi ollut hankalaa.



**Kuva 18.** Tuorepakastetun nokkosen homepesäkkeitä.

Petrifilmillä oli yli puolelle pinta-alalle levinneitä pesäkkeitä, joten tulos olisi pitänyt hylätä. Tässä on kuitenkin arvioitu pesäkemäärä laskemalla pesäkkeet neljännekseltä ja kerrottu neljällä. Pesäkkeiden tunnistamista ja laskemista helpotti valokuvan ottaminen ja suurentaminen tietokoneen näytöllä, jolloin homepesäkkeen tumma keskusta erottui.

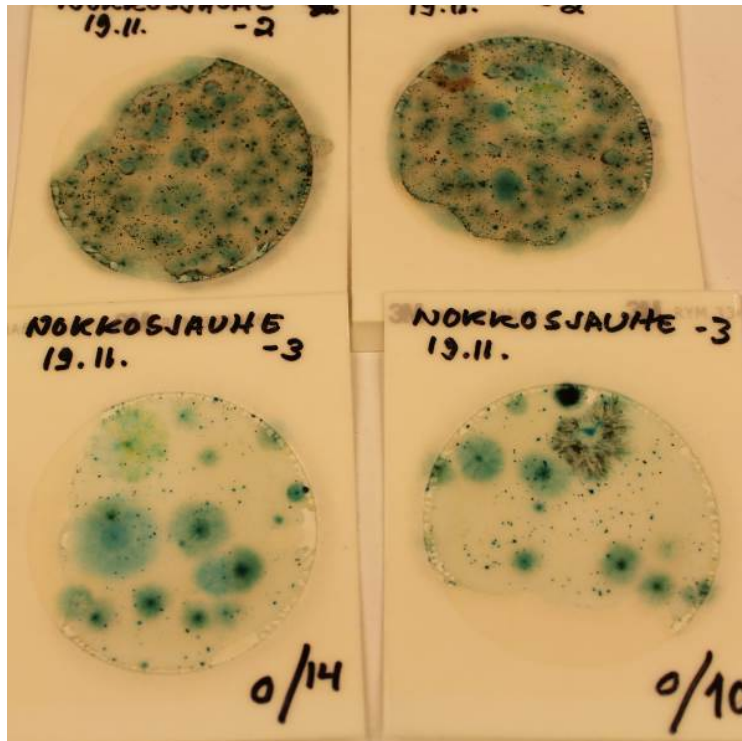
Pesäkemääräksi arvioitiin:

$$\frac{(4 \times 7) + (4 \times 10)}{(2 \times 1 \text{ ml}) \times 0,001} = 68 / 0,002 = 34\,000 \text{ pmy/g}$$



Esim. 4. Nokkosjauhe, RYM-petrifilmi. Tehty laimennokset 1:100 (-2) ja 1:1000 (-3). Tulokset on laskettu (-3) laimennoksesta koska (-2) laimennoksesta pesäkkeiden laskeminen olisi ollut hankalaa.

$$\frac{14 + 10}{(2 \times 1 \text{ ml}) \times 0,001} = 24 / 0,002 = 12\ 000 \text{ pmy/g}$$



**Kuva 19.** Nokkosjauheen homepesäkkeitä.

## 5. Viitteet

3M Suomi. 3M Petrifilm -kasvialustat – näytealustat (englanniksi, 3M Petrifilm Sample plates). Saatavissa:

<https://multimedia.3m.com/mws/media/777561O/3m-petrifilm-plates-sample-plates.pdf>

3M 2018. Nopea hiivojen ja homeiden kasvatusalusta. Tuoteseloste. Saatavissa:

<https://multimedia.3m.com/mws/media/899862O/3m-petrifilm-rapid-yeast-and-mold-count-plate-instructions-to-use.pdf>

3M 2020. Hiivojen ja homeiden kasvatusalusta. Tuoteseloste 6407/6417/6445. Saatavissa:

<https://multimedia.3m.com/mws/media/697883O/3m-petrifilm-yeast-and-mold-count-plate-product-instructions.pdf>

3M Yeast and Mold Count Plate. Interpretation guide. Saatavissa:

<https://multimedia.3m.com/mws/media/236251O/interpretation-guide-3m-petrifilm-yeast-and-mold-count-plate.pdf>

3M Rapid Yeast and Mold Count Plate. Interpretation guide. Saatavissa:

<https://multimedia.3m.com/mws/media/1716411O/3m-petrifilm-rapid-yeast-mold-count-interpretation-guide.pdf>

Kunnas, S., Liimatainen, L., Mäki, M., Pihlava, J.-M. & Hietaniemi, V. 2020. Laatua ja laadunhallintaa luonnontuotealalle. Luonnonvara- ja biotalouden tutkimus 96/2020. Luonnonvarakeskus. Helsinki. 48 s. <http://urn.fi/URN:ISBN:978-952-380-111-0>

Labema n.d. Käyttöohjeet – 3M™ Petrifilm™ tuotteet.

Ruokavirasto 2019. Ruokavirasto 2019. Mikrobiologisten tulosten laskeminen. Toimintaohje LAB 703/1. Saatavissa:

[https://www.ruokavirasto.fi/globalassets/laboratoriopalvelut/vertailulaboratoriotoiminta/ohjeita-laboratorioille/lab\\_703\\_mikrobiologisten\\_tulostenlaskeminen.pdf](https://www.ruokavirasto.fi/globalassets/laboratoriopalvelut/vertailulaboratoriotoiminta/ohjeita-laboratorioille/lab_703_mikrobiologisten_tulostenlaskeminen.pdf)

## Liite 1. Laimennosliuoksen valmistus

Tarvikkeet:

Jozo joditon suola

Pullotettu kaupan lähdevesi (vesijohtovedessä voi olla klooria)

Kahden litran kattila

Laimennosliuoksen valmistusta varten tehdään ensin litra **perusliuosta**, joka sisältää 8,5 % suolaa. Tästä laimentamalla saadaan 10 litraa **laimennosliuosta**. Punnitse joditonta Jozo-suolaa 85 g. Jodi voi estää mikrobien kasvua, joten on varmempaa käyttää joditonta. Lisää kaupan lähdevettä niin, että kokonaispaino on kilo. Keitä kiehumispisteeseen ja anna jäähtyä.

Laimennosliuos valmistetaan perusliuoksesta laimentamalla 1:10. Tee muovipulloon merkki litran kohdalle. Ota desilitra perusliuosta ja lisää litran merkkiin asti (900 ml) pullotettua vettä. Sekoita hyvin. Saadaan litra laimennosliuosta, jossa on 0,85 % suolaa. Vastaavasti voidaan valmistaa puoli litraa laimennosliuosta.





luke.fi

Luonnonvarakeskus  
Latokartanonkaari 9  
00790 Helsinki  
puh. 029 532 6000